

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 660 194

②1 N° d'enregistrement national : 91 04060

⑤1 Int Cl⁵ : A 61 K 31/415, 31/54, 31/435/(A 61 K 31/415, 31:135, 31:415, 31:395, 31:54, 31:415, 31:435, 31:415)

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 03.04.91.

③0 Priorité : 03.04.90 US 503648.

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 04.10.91 Bulletin 91/40.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche : *Le rapport de recherche n'a pas été
établi à la date de publication de la demande.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : Société dite: AMERICAN CYANAMID
COMPANY — US.

⑦2 Inventeur(s) : Mallon Veronica et Silva Jillian.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Cabinet Beau de Loménie.

⑤4 Utilisation d'un composé choisi dans un groupe déterminé pour fabriquer un médicament utile pour inverser la résistance aux médicaments multiples vis-à-vis des agents anticancéreux de synthèse.

⑤7 Utilisation d'un composé choisi dans le groupe comprenant les suivants:
vérapamil, cyclosporine A, trifluoropérazine, thioridazine, chlorpromazine, quinidine, chloroquine, perhexiline et nifédipine ou d'un sel pharmaceutiquement acceptable dudit composé pour la fabrication d'un médicament utile pour mettre en œuvre une méthode pour inverser la résistance aux médicaments multiples vis-à-vis des agents anticancéreux de synthèse, notamment le bisantène chez l'homme ou les animaux à sang chaud, par co-administration à ceux-ci dudit composé avec ledit agent anticancéreux de synthèse.

FR 2 660 194 - A1



ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE DE L'INVENTION

1. Domaine de l'invention

L'invention concerne l'utilisation d'un composé choisi dans le groupe des produits suivants : vérapamil, cyclosporine A, trifluoropérazine, thioridazine, chlorpromazine, quinidine et chloroquine pour fabriquer un médicament utile pour mettre en oeuvre une méthode pour inverser la résistance aux médicaments multiples vis-à-vis des agents anticancéreux de synthèse et plus particulièrement pour inverser la résistance aux médicaments multiples observée dans la chimiothérapie du cancer due à une expression excessive de la glycoprotéine p 170. L'utilisation d'un tel composé sur un clone de la lignée cellulaire du carcinome ovarien humain OVCAR 3 (désigné par OVCAR 3-S1R) qui est choisi pour sa résistance au bisantène, démontre l'inversion de la résistance au bisantène.

2. Description de l'art antérieur

L'échec de la chimiothérapie de combinaison a été une longue histoire documentée. La résistance simultanée à un grand nombre de médicaments utilisés en combinaison était une éventualité courante inattendue dans la chimiothérapie du cancer.

Jusqu'à 1960, la recherche était centrée sur la résistance à un seul médicament plus facile à comprendre. La pénétration dans le domaine de la résistance aux médicaments multiples a été faite par des chercheurs expérimentant la résistance aux médicaments dans les cellules tumorales in vitro. Les mutants résistants aux médicaments, choisis parmi les cellules résistant à un seul médicament anticancéreux dérivé de produits naturels, montrent souvent une résistance croisée à d'autres médicaments entièrement différents dérivés de produits naturels (Ling, V., Gottesman, M.M., ed. Molecular Cell Genetics, New York, NY, John Wiley & Sons ; 1985 : 773-787). La résistance aux médicaments multiples permet à une cellule de supporter les effets de molécules toxiques dont la taille, la structure et le site d'action dans la cellule varient.

Les chercheurs ont trouvé que les cellules qui sont résistantes aux médicaments ne laissent pas le médicament atteindre l'intérieur de la cellule, où ils pourraient exhiber son effet

léthal désiré. La membrane de surface de la cellule doit être pénétrée en premier par le médicament. Il a été trouvé qu'une glycoprotéine unique existe en quantités croissantes dans les cellules résistant aux médicaments. Cette glycoprotéine associée à la membrane cellulaire, qui est de grande taille (poids moléculaire 170 000), a été désignée par p 170 ou P-glycoprotéine en raison de son association avec la barrière de perméabilité aux médicaments. La P-glycoprotéine peut agir comme une pompe d'évacuation pour débarrasser les cellules des toxines (Fogo, A.T., 1989, The Cancer Bulletin, 41, N° 1, 26-30).

Les études récentes ont trouvé qu'une variété de composés peut inhiber la fonction de la P-glycoprotéine, en rendant les cellules tumorales résistant aux médicaments multiples, sensibles aux médicaments qui seraient autrement inefficaces (Tsuruo, T., Irda, H., Tsukagoshi, S., et Sakurai, Y., Cancer Research, 1982, 42, 4730-4733). Ces médicaments inhibiteurs ("chimiosensibilisants") peuvent se lier à la P-glycoprotéine, permettant ainsi à l'agent chimiothérapeutique du cancer de s'accumuler dans la cellule et de la détruire.

Les inhibiteurs calciques (tels que vérapamil), les inhibiteurs non calciques (quinidine) et les inhibiteurs de calmoduline (trifluoropérazine) ont été utilisés comme chimiosensibilisants en combinaison avec des médicaments anticancéreux dérivés des produits naturels (Gerlach, J.H., Kartnu, N., Bell, D.R., et Ling, V., Cancer Surveys, Vol. 5, N° 1, 1986, 25-46).

SOMMAIRE DE L'INVENTION

La présente invention concerne l'utilisation d'un composé choisi dans le groupe comprenant les suivants :

vérapamil, cyclosporine A, trifluoropérazine, thioridazine, chlorpromazine, quinidine, chloroquine, perhexiline et nifédipine, ou d'un sel pharmaceutiquement acceptable dudit composé, pour la fabrication d'un médicament utile pour mettre en oeuvre une méthode pour inverser la résistance aux médicaments multiples vis-à-vis des agents anticancéreux de synthèse, chez l'homme ou chez les animaux à sang chaud, par co-administration à l'homme ou à

l'animal à sang chaud dudit composé avec ledit agent anticancéreux de synthèse ; plus particulièrement ce médicament est destiné à vaincre la résistance aux médicaments multiples associée au p 170 induite par le bisantène, un médicament anticancéreux de synthèse.

05 L'acquisition de la résistance aux médicaments multiples est considérée comme la cause principale de l'échec du traitement chimiothérapeutique des tumeurs malignes. L'une des altérations les plus fréquemment rapportées dans les cellules résistant aux médicaments multiples est l'expression excessive de la glycoprotéine
10 membranaire 170kd, la P-glycoprotéine. Nous avons isolé un clone de la lignée cellulaire du carcinome ovarien humain OVCAR 3 désigné par OVCAR 3-S1R, qui a été sélectionné pour sa résistance au bisantène par addition échelonnée du bisantène aux cultures cellulaires. Le but de cette étude est d'examiner le schéma de résis-
15 tance à divers produits naturels et synthétiques pour déterminer si la résistance est associée à l'expression accrue de P-glycoprotéine.

Les résultats des études montrent que les cellules OVCAR 3-S1R ont une résistance croisée élevée vis-à-vis des
20 produits naturels adriamycine, vincristine et calichéamicine, et sont sensibles au produit synthétique mitoxantrone. Comme on pourrait également le prédire, le clone résistant comparativement à la lignée parentale sensible montre une inaptitude à retenir la rhodamine 123 comme montrée par l'analyse par FACS (sélectionneur de
25 cellules activées par fluorescence). Nos études démontrent également un accroissement de l'expression de la P-glycoprotéine utilisant l'anticorps C219 traité à la fluorescéine et l'analyse par FACS pour évaluer le degré de liaison à la lignée cellulaire résistante et sensible. Des études ont également été faites pour aborder
30 l'inversion de la résistance au bisantène par le vérapamil et la cyclosporine A, deux agents qui sont connus comme pouvant inverser la résistance aux produits naturels. La sensibilité vis-à-vis du bisantène est démontrée in vitro lorsque des cellules de OVCAR 3-S1R, qui sont résistantes au bisantène, sont incubées en
35 présence du vérapamil ou de la cyclosporine A. Toutefois, le mécanisme selon lequel le vérapamil et la cyclosporine A (CsA) augmen-

tent la sensibilité des cellules vis-à-vis du bisantrène apparaît totalement différent car les dosages de liaison compétitive démontrent que le vérapamil agit par compétition pour occuper le site de liaison du C219 alors que la cyclosporine A ne le fait pas.

05 Ces études démontrent que la résistance aux médicaments multiples associée à la P-glycoprotéine vis-à-vis d'un composé anticancéreux synthétique peut être induite par des agents tels que la cyclosporine A et le vérapamil et que le mécanisme pour inverser la

10 résistance est similaire à celui observé pour les cellules rendues résistantes aux produits naturels.

DESCRIPTION DU MODE DE REALISATION PREFEREE

La présente invention convient pour préparer un médicament pour inverser la résistance associée au p 170 vis-à-vis

15 d'un composé synthétique, le bisantrène, dans le traitement des tumeurs malignes.

La résistance aux médicaments multiples due à l'expression excessive de la P-glycoprotéine est communément associée seulement aux médicaments anticancéreux naturels. D'une manière

20 historique, la littérature mentionne de nombreux exemples de résistance aux agents anticancéreux naturels où la résistance est associée à l'expression excessive du p 170. Toutefois, jusqu'à présent, il n'a pas été démontré que cette résistance due à l'expression de la glycoprotéine p 170 se produit dans le cas des

25 agents anticancéreux synthétiques. En milieu clinique, le médecin peut supposer que lorsqu'un patient devient réfractaire à un traitement par un produit naturel tel que l'adriamycine, la tumeur ne doit pas exhiber de résistance croisée aux agents anticancéreux synthétiques. Il existe quelques cas où la résistance aux agents

30 synthétiques tels que la mitoxantrone a été démontrée mais les cellules sont négatives pour l'expression du p 170. Ainsi, il existe un mécanisme alterné responsable de cette résistance.

Les études présentées ici démontrent que :

(1) La résistance aux médicaments multiples associée à l'expression

35 excessive du p 170 peut se produire avec un médicament anticancéreux synthétique tel que le bisantrène ; (2) cette résistance peut

être vaincue in vitro avec des agents tels que le vérapamil et la cyclosporine A qui sont utilisés traditionnellement pour vaincre la résistance aux produits naturels ; (3) l'exposition clinique aux médicaments anticancéreux synthétiques peut entraîner le développement d'un schéma de résistance du type résistance aux médicaments multiples (MDR).

Nous avons généré un clone de la lignée cellulaire du carcinome ovarien OVCAR 3, désigné par OVCAR 3-S1R, qui est sélectionné pour sa résistance au bisantène par addition échelonnée de médicaments aux cultures cellulaires. Nous avons démontré que ces cellules expriment des niveaux élevés de P-glycoprotéine. La lignée parentale sensible au bisantène montre une très faible expression de p 170. Ainsi, la résistance à l'agent anticancéreux synthétique, le bisantène, est en corrélation avec l'expression de cette protéine d'efflux. Ces cellules peuvent être rendues sensibles au bisantène lorsqu'elles croissent en présence de vérapamil, de cyclosporine A, de trifluoropérazine, de thioridazine, de chlorpromazine, de quinidine et de chloroquine. Tous ces composés, dont les structures sont montrées ci-après, sont des composés connus, qui peuvent être préparés en utilisant des méthodes rapportées dans la littérature.

Les composés actifs peuvent être administrés par voie orale, par exemple, avec un diluant inerte ou avec un support comestible assimilable ou bien ils peuvent être enfermés dans des capsules en gélatine dures ou molles, ou bien ils peuvent être mis en comprimés ou incorporés directement à un produit alimentaire ou à un produit de régime. Pour l'administration thérapeutique orale, ces composés actifs peuvent être incorporés avec des excipients et utilisés sous la forme de comprimés, de pastilles, de capsules, d'élixirs, de suspensions, de sirops, de tablettes et analogues. Ces compositions et préparations doivent contenir au moins 0,1 % de composés actifs. Le pourcentage des compositions et des préparations peut bien entendu varier et peut être compris commodément entre environ 2 % et environ 60 % en poids de l'unité. La quantité de composé actif dans ces compositions thérapeutiques est telle qu'un dosage approprié soit obtenu. Les compositions et prépara-

tions préférées conformément à la présente invention sont présentées de façon qu'une forme unitaire de dosage orale contienne entre environ 5 et 200 mg de composé actif.

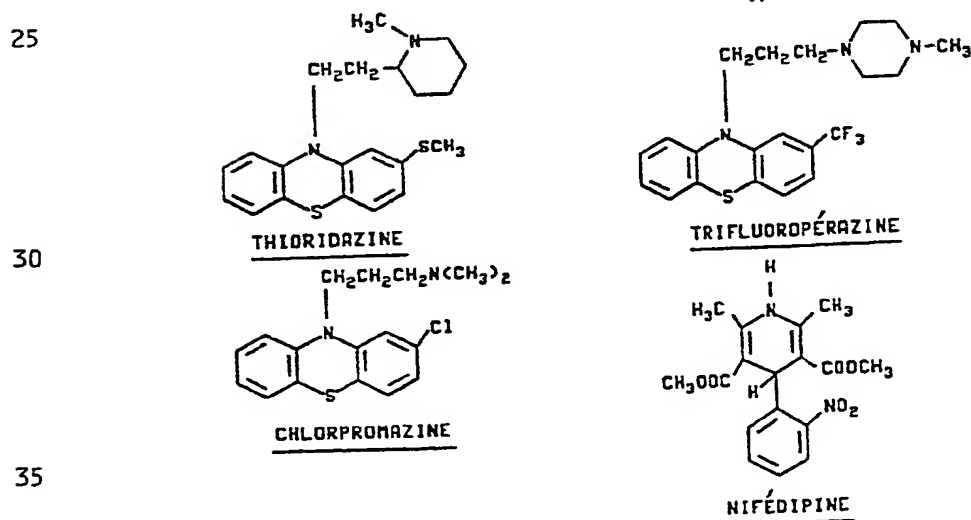
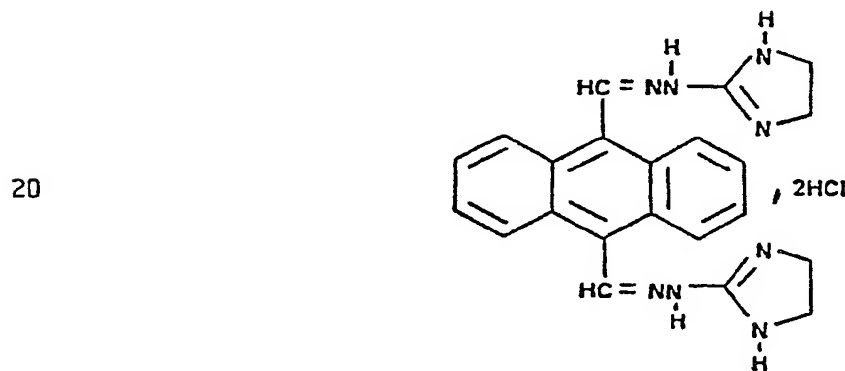
Les comprimés, les pastilles, les pilules, les capsules
05 et analogues peuvent également contenir des adjuvants suivants : un
liant tel que la gomme adragante, la gomme arabique, l'amidon de
maïs ou la gélatine ; des excipients tels que le phosphate dical-
cique ; un agent désintégrant tel que l'amidon de maïs, l'amidon de
10 pomme de terre, l'acide alginique et analogues ; un lubrifiant tel
que le stéarate de magnésium ; et un agent édulcorant tel que le
saccharose, le lactose ou la saccharine ou un agent aromatisant tel
que la menthe poivrée, l'essence de wintergreen ou l'arôme de
cerise. Lorsque la forme unitaire de dosage est une capsule, elle
peut contenir en plus des matériaux du type mentionné ci-dessus, un
15 véhicule liquide. Divers autres matériaux peuvent être présents
sous forme d'enrobage ou pour modifier la forme physique de l'unité
de dosage. Par exemple, les comprimés, les pilules ou les capsules
peuvent être enrobés de gomme laque, de sucre ou avec les deux. Un
sirop ou un élixir peut contenir le composé actif, le saccharose
20 comme agent édulcorant, le méthyl- et le propylparabens comme
conservateurs, un colorant et un aromatisant tel que l'arôme de
cerise ou d'orange. Bien entendu, toute matière utilisée dans la
préparation d'une forme unitaire de dosage doit être pharmaceuti-
quement pure et substantiellement non toxique dans les quantités
25 utilisées. De plus, ces composés actifs peuvent être incorporés
dans des préparations et des formulations à libération retardée.

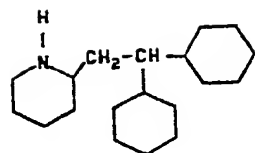
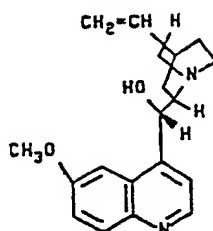
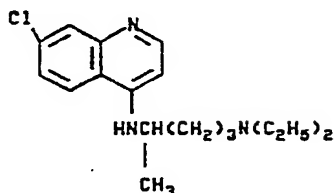
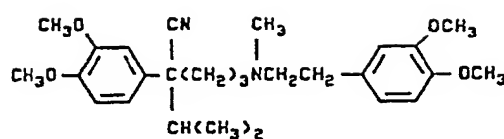
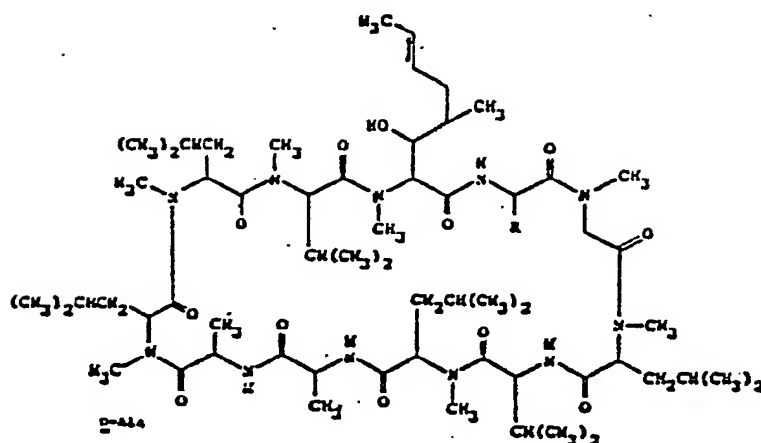
Ces composés actifs peuvent également être administrés
par voie parentérale ou intrapéritonéale. Des solutions ou suspen-
sions de ces composés actifs sous la forme de base libre ou de sels
30 pharmaceutiquement acceptables peuvent être préparées dans l'eau,
mélangée de façon appropriée avec un agent surfactant tel que le
laurylsulfate de sodium ou un émulsifiant ou stabilisant tel que
l'hydroxypropylcellulose. Des dispersions peuvent également être
préparées dans du glycérol, dans des polyéthylèneglycols liquides
35 et dans leur mélange dans les huiles. Dans les conditions ordi-

naires de stockage et d'utilisation, ces préparations contiennent un conservateur pour empêcher la croissance des micro-organismes.

Les formes pharmaceutiques utilisables pour l'injection incluent les solutions ou les dispersions aqueuses stériles et les poudres stériles pour les préparations extemporanées de solutions ou de dispersions injectables stériles. Dans tous les cas, la forme doit être stérile et doit être fluide pour être facilement injectée. Elle doit être stable dans les conditions de fabrication et de stockage et doit être conservée vis-à-vis de l'action contaminante des micro-organismes tels que les bactéries et les champignons. Le véhicule peut être un solvant ou un milieu dispersant contenant par exemple l'eau, l'éthanol, un polyol (par exemple glycérol, propylèneglycol et polyéthylèneglycol liquide), des mélanges appropriés de ceux-ci, et les huiles végétales.

15 Structure du chlorhydrate de bisantrène



PERHEXILINEQUINIDINECHLOROQUINEVÉRAPAMILCyclosporine A

Les résultats des essais décrits ici montrent que le clone 0VCAR 3-S1R résistant, comparativement à la lignée parentale sensible, montre une inaptitude à retenir la rhodamine 123 (R_{123}) comme montré par l'analyse par FACS (figure 1). Les résultats montrent une fixation de R_{123} nette réduite de façon marquée par les cellules résistantes comparativement aux cellules sensibles, suggérant qu'un mécanisme d'efflux, tel que celui dû à l'expression de p 170, est responsable de la rétention réduite de R_{123} .

Nous avons également démontré un accroissement de l'expression de la P-glycoprotéine utilisant l'anticorps C219 traité à la fluorescéine et l'analyse par FACS pour évaluer la liaison à la lignée cellulaire résistante et sensible (tableau 1).
05 La liaison directe du C219 à la membrane cellulaire se produit lorsque la résistance aux médicaments est due à l'expression de la glycoprotéine p 170 dans la membrane de ces cellules (figures 2). Les cellules de OVCAR 3-S1R, mais non les cellules parentales sensibles, montrent l'expression de p 170 dans la membrane plasma-
10 tique comme déterminée par la liaison avec le C219.

La raison pour les protocoles mentionnés ci-dessus est basée sur le taux élevé d'efflux du médicament à partir des cellules qui sont résistantes en raison de l'accroissement de l'expression de p 170. Lorsque les cellules sont résistantes en
15 raison de l'efflux accru, alors le R_{123} sera fixé et excrété rapidement mais demeurera positif pour l'anticorps C219 marqué au FITC. Les cellules sensibles ou les cellules résistantes dues à un mécanisme autre que l'efflux accru seront teintées positivement par la rhodamine et négativement par le C219 marqué au FITC.

20 Les cellules exprimant le p 170 exhibent une résistance croisée à une variété de produits naturels structuralement non apparentés. Etant donné que nous avons démontré que les cellules résistantes au bisantène expriment le p 170, nous avons ensuite testé le schéma de résistance pour voir s'il est similaire à celui
25 exhibé par les cellules résistantes aux produits naturels (tableau 2). Comme il est vrai avec les cellules résistantes aux produits naturels qui expriment des niveaux élevés de p 170, les cellules de OVCAR 3-S1R montrent un schéma MDR de résistance à l'adriamycine et à la vincristine et une plus grande sensibilité à
30 la mitoxantrone.

Le vérapamil, la cyclosporine A, comme montré dans un dosage de prolifération (tableau 3), peuvent inverser la résistance aux médicaments induite par le bisantène par liaison compétitive à la protéine d'efflux p 170, inhibant ainsi le transport du médicament
35 hors de la cellule. Le vérapamil est toxique aux cellules de OVAR 3-S1R à une concentration de 100 µg/ml mais non toxique à des

concentrations inférieures. Le bisantrène seul à 10 µg/ml n'est pas toxique. Toutefois, lorsqu'il est combiné à des concentrations données inférieures à 100 µg/ml, des effets inhibiteurs significatifs sont observés. La cyclosporine A, lorsqu'elle est testée
05 seule, est tout à fait toxique vis-à-vis des cellules de OVCAR 3-S1R. Des concentrations qui testées seules sont non toxiques (0,15 et 0,075 µM) sont capables d'améliorer la sensibilité de la lignée cellulaire vis-à-vis du bisantrène. Toutefois, cette donnée suggère que la cyclosporine A peut avoir une marge
10 thérapeutique très étroite lorsqu'elle est testée in vivo.

Les résultats des composés testés additionnels : trifluoropérazine, thioridazine, chlorpromazine, quinidine, chloroquine, perhexiline et nifédipine, sur l'inversion de la résistance induite par le bisantrène dans les cellules de OVCAR 3-S1R sont montrés
15 dans les figures 3-9.

Matériels et méthodes

Culture cellulaire

Des cellules de OVCAR 3-S1R sont clonées à partir de la lignée cellulaire parentale OVCAR 3 utilisant le FACS 440. Les
20 cellules sont maintenues dans le milieu RPMI-1640 supplémenté par 10 % de sérum de veau foetal et par 0,2 % de ITS. Les cellules parentales de OVCAR 3 sont initialement exposées à 0,01 µg/ml de bisantrène. Une fois la confluence obtenue, les cellules sont trypsinisées et les cellules sont divisées dans deux flacons et
25 maintenues dans 0,01 µg/ml de bisantrène pendant plusieurs passages. Une fois les cellules adaptées à cette concentration de bisantrène, la concentration est portée à 0,1 µg/ml. Après avoir suivi le même procédé de sélection, les concentrations sont augmentées sur une période de plusieurs mois à 0,25, 1,0, 2,0, 5,0, 7,5
30 et 10 µg/ml de bisantrène. Aux concentrations utilisées dans ces études (10 µg/ml) le bisantrène n'a aucun effet inhibiteur sur la lignée cellulaire de OVCAR 3-S1R.

Exemple 1

La comparaison de la fixation de rhodamine (R_{123}) par les cellules de carcinome ovarien sensibles (S1) et résistantes (S1R) au bisantrène est démontrée à la figure 1.

05 Les cellules sont incubées à la température ambiante dans du R_{123} ($0,1 \mu\text{g}$ pour 10^6 cellules). Au bout de 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45 et 60 min, un échantillon contenant 10^6 cellules est séparé, granulé et lavé dans du PBS pour éliminer l'excès de R_{123} . Les
10 cellules sont fixées dans 1 % de paraformaldéhyde avant l'analyse sur le sélecteur de cellules activées par fluorescence (FACS 440, Becton Dickinson). Les filtres appropriés sont utilisés pour permettre l'enregistrement de la lumière transmise maximale. Les échantillons sont excités à une longueur d'onde de 514 nm et l'émission est mesurée à travers un filtre 585/42 BP. Comme montré
15 à la figure 1, les cellules de OVCAR 3-S1R résistantes démontrent une diminution marquée de fixation de rhodamine comparativement aux cellules parentales sensibles. Ces résultats suggèrent qu'un mécanisme d'efflux, tel que l'expression de p 170, est responsable de la rétention réduite de rhodamine.

20

Exemple 2

La réactivité des cellules ovariennes sensibles S1 et résistantes S1R avec l'anticorps C219 marqué au FITC est démontrée dans le tableau 1.

25 Les cellules sont lavées et fixées dans du méthanol froid à 70 % pendant 10 min à -20°C . Les cellules sont ensuite lavées à trois reprises par du PBS et incubées dans un milieu bloquant (1 % de BSA (albumine de sérum bovin), 40 % de sérum de souris normales, 20 % de sérum de veau foetal) à la température ambiante pendant
30 90 min pour réduire la liaison non spécifique. L'anticorps C219 marqué au FITC est ajouté aux cellules pendant une période d'incubation de 60 min ($100 \mu\text{l}$ pour 10^6 cellules). Les cellules sont lavées à trois reprises par du PBS contenant 1 % de BSA, et remises en suspension dans 1 % de paraformaldéhyde et analysées par FACS.

Tableau 1

Réactivité des cellules ovariennes sensibles S1 et résistantes S1R
avec l'anticorps C219 marqué au FITC

05	Anticorps	Dilution	Concentration finale	% de réactivité	
				S1 sensible	S1R résistante
	C219	1 : 10	5 µg/ml	9,0	66,0
		1 : 20	2,5 µg/ml	2,0	51,0
10	négatif	1 : 10	-	1,0	3,0
	Sérum				
	témoin	1 : 20	-	0,0	2,0

15 L'accroissement de la réactivité des cellules résistantes S1R avec l'anticorps C219, comparativement à celui des cellules parentales sensibles, suggère un accroissement de l'expression de p-glycoprotéine dans la lignée cellulaire résistante.

20 Exemple 3

La liaison directe de l'anticorps C219 à la membrane cellulaire se produit lorsque la résistance aux médicaments est due à l'expression de la glycoprotéine p 170 dans la membrane. La détermination de l'expression de p 170 dans les membranes des
25 cellules de OVCAR 3-S1R par l'analyse dite "Western Blot" est montrée à la figure 2.

La méthode employée pour la purification membranaire est une modification de la technique de séparation en deux phases de Brunette et Till (1971). Les dosages de protéines sont faits et des
30 quantités équivalentes de protéines sont déposées en couche sur des gels à gradient de 4 à 10 %. Les protéines membranaires sont transférées par électrophorèse à un papier de nitrocellulose qui est incubé avec l'anticorps C219 (2 µg/ml) suivi d'une seconde incubation avec le Ig anti-souris de mouton marqué par I^{125} . Le
35 papier de nitrocellulose est ensuite exposé à un film de Kodak XOMAT. Les résultats de l'analyse dite "Western Blot" donnés

dans la figure 2 démontrent que l'anticorps C219 se lie aux cellules de OVCAR 3-S1R résistant au bisantrène, mais non aux cellules parentales sensibles, suggérant l'expression de la glycoprotéine p 170 dans les cellules résistantes.

05

Exemple 4

Le schéma de résistance des cellules de OVCAR 3-S1R est montré dans le tableau 2.

Les cellules de OVCAR 3-S1R et les cellules de lignée parentale S₁ sont cultivées dans l'agarose contenant le milieu (1 000 cellules par disque de 35 mm), avec des concentrations croissantes de composés testés. La CI₅₀ pour les deux lignées est déterminée et la résistance multiple est calculée en divisant la CI₅₀ de la lignée résistante par la CI₅₀ de la lignée sensible.

15

Tableau 2

Schéma de résistance des cellules de OVCAR 3-S1R

	<u>Agent testé</u>	<u>Résistance multiple</u>
20	Bisantrène	≥ 250
	Adriamycine	≥ 125
	Vincristine	100
	Mitoxantrone	10

25

Les résultats mentionnés ci-dessus démontrent que les cellules de OVCAR 3-S1R montrent une résistance à divers médicaments incluant le bisantrène.

Exemple 5

30

L'effet du vérapamil et de la cyclosporine A sur l'inversion de la résistance au bisantrène dans les cellules de OVCAR 3-S1R est montré dans le tableau 3.

Des cellules de OVCAR 3-S1R sont déposées en couche sur des plaquettes de microtitrage à 96 puits à fond plat (10⁵ cellules/puits). Les cellules sont préincubées à l'aide de 100 µl de vérapamil ou de CsA pendant 1 h à 37°C. Le bisantrène est

35

ensuite ajouté (100 µl/puits) et les plaquettes sont incubées à 37°C dans 7 % de CO₂ pendant 3 jours. Les cellules sont ensuite pulsées avec la ³H-thymidine (0,5 µCi par puits) pendant une nuit. Après 3 cycles de congélation, décongélation, les cellules sont
 05 recueillies en utilisant un dispositif à récolter les cellules. Le pourcentage d'inhibition de la croissance est déterminé en utilisant la formule :

$$10 \quad \frac{A - B}{A} \times 100$$

dans laquelle A = CPM (coups par minute) provenant des puits traités par le bisantrène seul et B = CPM à partir des puits traités par le composé testé plus le bisantrène.

15

Tableau 3

Effet du vérapamil et de la cyclosporine A sur l'inversion de la résistance au bisantrène dans les cellules de OVCAR 3-S1R

20 A. Effet du vérapamil

	Bisantrène (µg/ml)	Vérapamil (µg/ml)	% d'inhibition de croissance ± D.S.
	10	-	0
25	-	100	34,6 ± 5,6
	-	50	2,1 ± 2,1
	-	10	9,1 ± 1,1
	-	5	13,4 ± 2,1
	-	1	0,35 ± 0,3
30	-	0,5	6,1 ± 4,2
	10	100	93,3 ± 0,2
	10	50	93,7 ± 0,84
	10	10	88,4 ± 2,8
	10	5	82,7 ± 2,5
35	10	1	75,3 ± 2,4
	10	0,5	68,9 ± 2,1

Tableau 3 (suite)B. Effet de la cyclosporine A (CsA)

05	Bisantrène (µg/ml)	CsA (µM)	% d'inhibition de croissance \pm D.S.
	10	-	0
	-	5,0	92,0 \pm 1,0
10	-	2,5	88,1 \pm 2,8
	-	1,25	88,5 \pm 1,0
	-	0,62	72,6 \pm 3,3
	-	0,31	46,2 \pm 2,8
	-	0,15	11,5 \pm 8,7
15	-	0,075	19,8 \pm 4,5
	-	0,037	0,0 \pm 0,0
	10	5,0	95,1 \pm 0,5
	10	2,5	90,9 \pm 1,2
	10	1,25	93,2 \pm 2,0
20	10	0,62	94,3 \pm 0,08
	10	0,31	92,8 \pm 2,2
	10	0,15	90,0 \pm 0,16
	10	0,075	70,0 \pm 4,6
	10	0,037	29,5 \pm 1,1
25			

Les résultats mentionnés dans le tableau 3 démontrent que le vérapamil et la cyclosporine A peuvent inverser la résistance au médicament vis-à-vis du bisantrène. Le bisantrène seul à 10 µg/ml est non toxique. Toutefois, lorsqu'il est combiné au vérapamil ou à la cyclosporine A à des dosages appropriés, on observe des effets inhibiteurs significatifs sur la croissance cellulaire.

Exemple 6

L'inversion de la résistance au bisantrène avec la trifluoropérazine, la thioridazine, la chlorpromazine, la quini-

dine, la chloroquine, la perhexiline et la nifédipine est montrée dans les figures 3-9.

05 Les cellules de OVCAR 3-S1R sont déposées en couche sur des plaquettes de microtitrage à 96 puits à fond plat (10^5 cellules/puits). Les cellules sont préincubées par 100 μ l de substances d'essai pendant 1 h à 37°C. Le bisantrène est ensuite ajouté (100 μ l/puits) et les plaquettes sont incubées à 37°C dans 7 % de CO₂ pendant 3 jours. Les cellules sont ensuite pulsées par la ³H-thymidine (0,5 θ μ Ci par puits) pendant une nuit. Au bout de 10 3 cycles de congélation, décongélation, les cellules sont recueillies en utilisant un dispositif à récolter les cellules. Le pourcentage d'inhibition de la croissance est déterminé en utilisant la formule :

15
$$\frac{A - B}{A} \times 100$$

20 dans laquelle A = CPM à partir des puits traités par le bisantrène seul et B = CPM pour les puits traités par le composé testé plus le bisantrène.

25 Ces résultats supportent l'utilité des agents tels que ceux testés précédemment pour vaincre la résistance associée à l'expression du p 170. Etant donné que jusqu'à présent l'expression du p 170 n'a pas été associée à l'utilisation des médicaments synthétiques pour la thérapie du cancer, les résultats donnés ici suggèrent que ce phénomène ne doit pas être la règle dans les essais de détermination posologique avec d'autres nouveaux agents synthétiques outre le bisantrène.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un composé choisi dans le groupe comprenant les suivants :
- 05 vérapamil, cyclosporine A, trifluoropérazine, thioridazine, chlorpromazine, quinidine, chloroquine, perhexiline et nifédipine, ou d'un sel pharmaceutiquement acceptable dudit composé, pour la fabrication d'un médicament utile pour mettre en oeuvre une méthode pour inverser la résistance aux médicaments multiples vis-à-vis des
- 10 agents anticancéreux de synthèse chez l'homme ou chez les animaux à sang chaud, par co-administration à l'homme ou à l'animal à sang chaud dudit composé avec ledit agent anticancéreux de synthèse.
2. Utilisation d'un composé selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit agent anticancéreux synthétique est le
- 15 bisantrène et ledit composé est le vérapamil.
3. Utilisation d'un composé selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit agent anticancéreux synthétique est le bisantrène et ledit composé est la cyclosporine A.
4. Utilisation d'un composé selon la revendication 1,
- 20 caractérisée en ce que ledit agent anticancéreux synthétique est le bisantrène et ledit composé est la trifluoropérazine.
5. Utilisation d'un composé selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit agent anticancéreux synthétique est le bisantrène et ledit composé est la thioridazine.
- 25 6. Utilisation d'un composé selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit agent anticancéreux synthétique est le bisantrène et ledit composé est la chlorpromazine.
7. Utilisation d'un composé selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit agent anticancéreux synthétique est le
- 30 bisantrène et ledit composé est la quinidine.
8. Utilisation d'un composé selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit agent anticancéreux synthétique est le bisantrène et ledit composé est la chloroquine.

9. Utilisation d'un composé selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit agent anticancéreux synthétique est le bisantrène et ledit composé est la perhexiline.

05 10. Utilisation d'un composé selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit agent anticancéreux synthétique est le bisantrène et ledit composé est la nifédipine.

Figure 1

Comparaison de la fixation de rhodamine par les cellules de carcinome ovarien sensibles (S1) et résistantes (S1R) au bisanthrène.

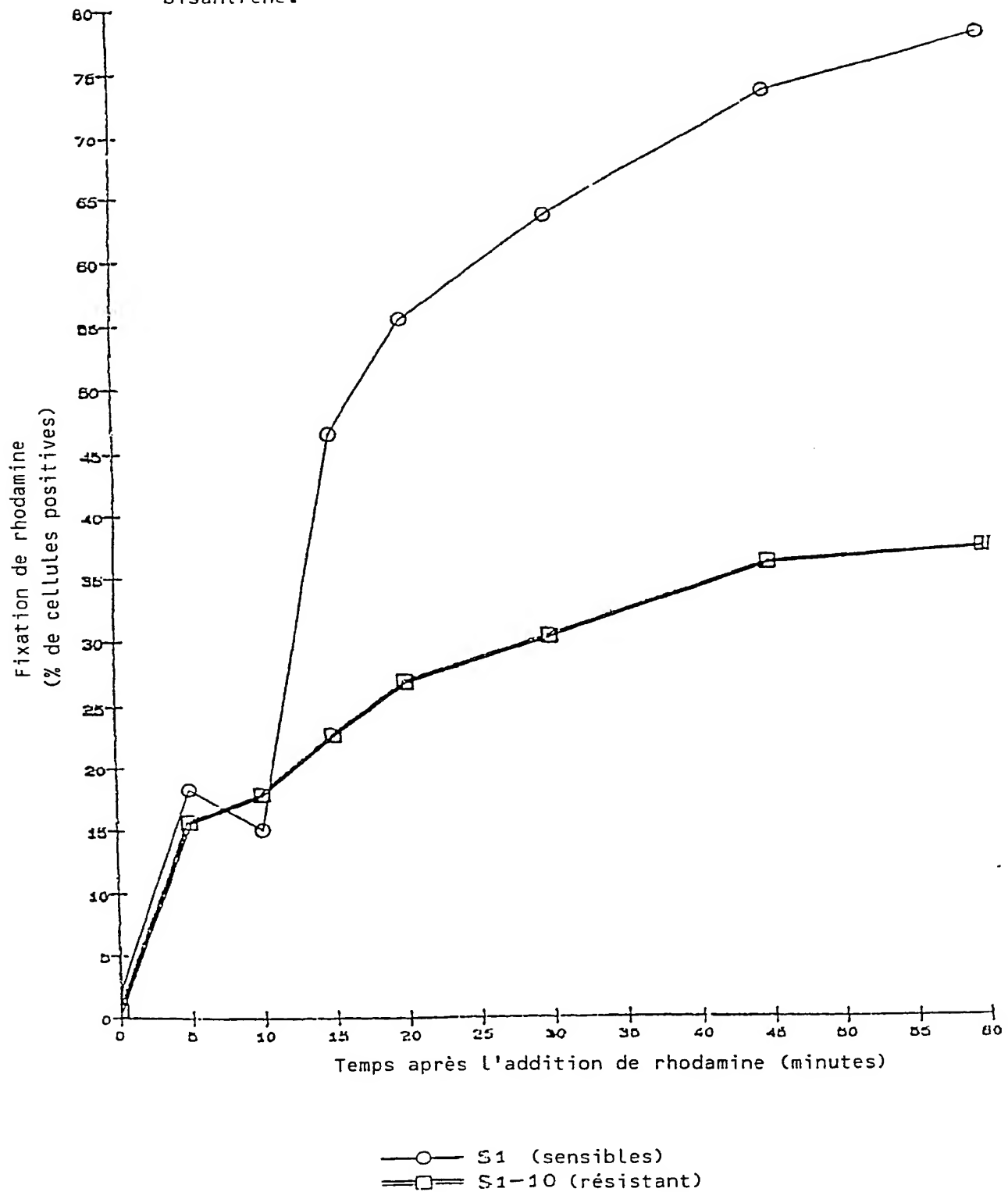
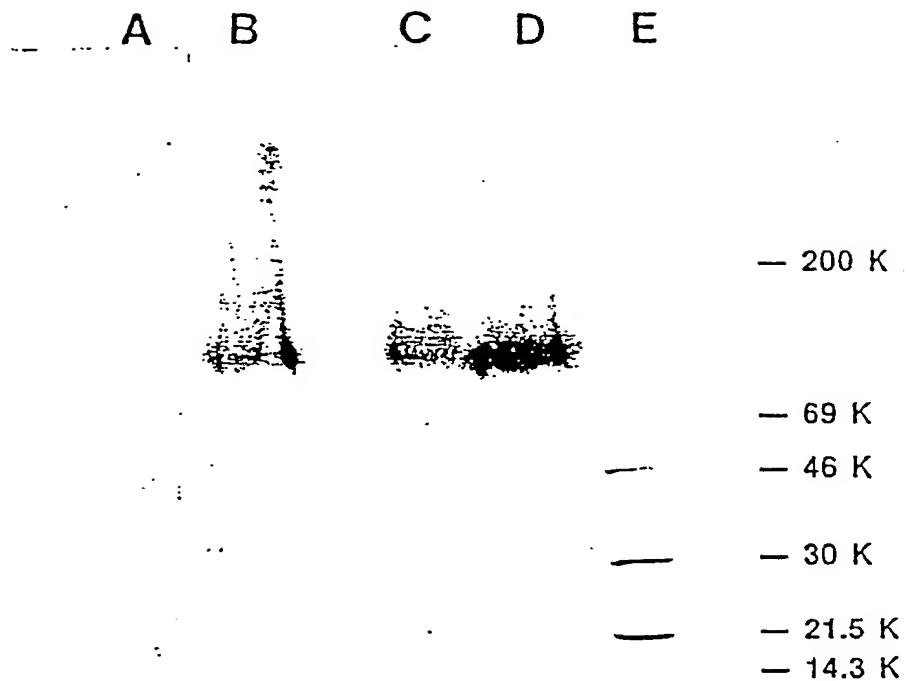


Figure 2

A: OVCAR 3 S1 sensible

B: MCF-7 résistant à l'adriamycine

C: Standard de CENTOCOR gp 170

D: OVCAR 3 S1R résistant au bisantrène

E: Standards de poids moléculaire

Figure 3

Effet de la trifluoropérazine sur l'inversion de la résistance induite par le bisantrène dans les cellules d'OVCAR 3 S1R de

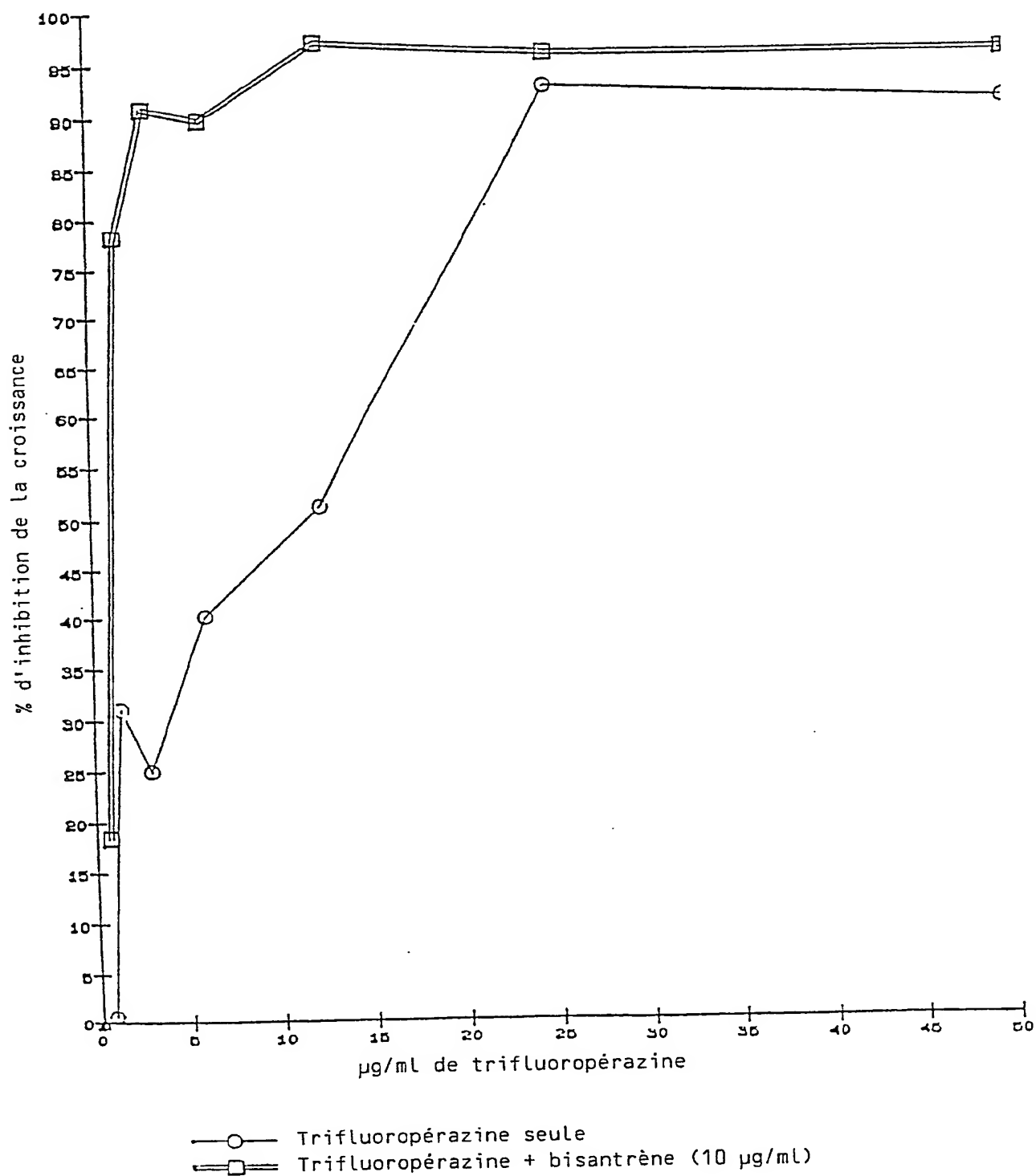


Figure 4

Effet de la thioridazine sur l'inversion de la résistance induite
par le bisantrène dans les cellules d'OVCAR 3 S1R

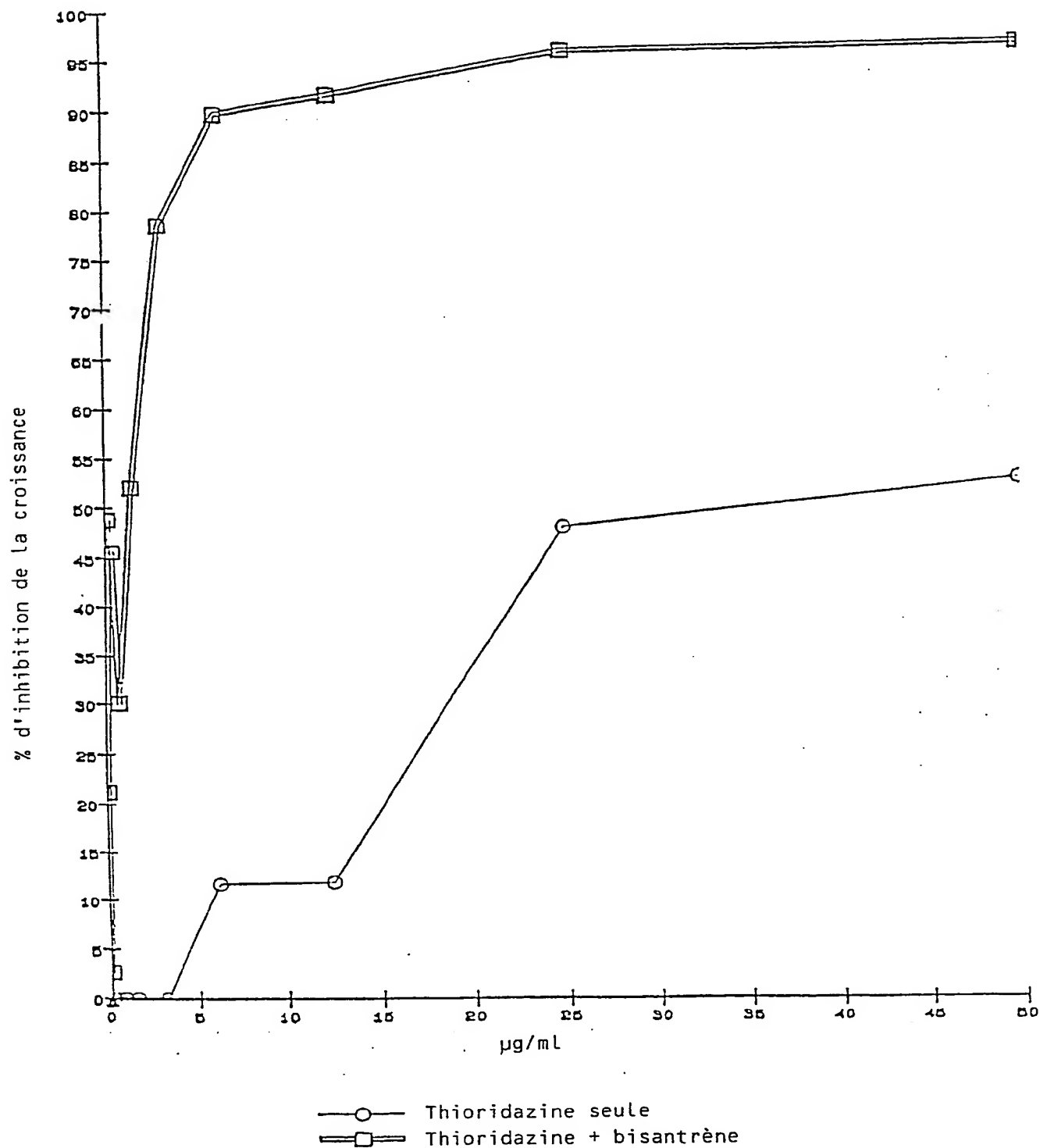


Figure 5

Effet de la chlorpromazine sur l'inversion de la résistance au bisantrène dans les cellules d'OVCAR 3 S1R.

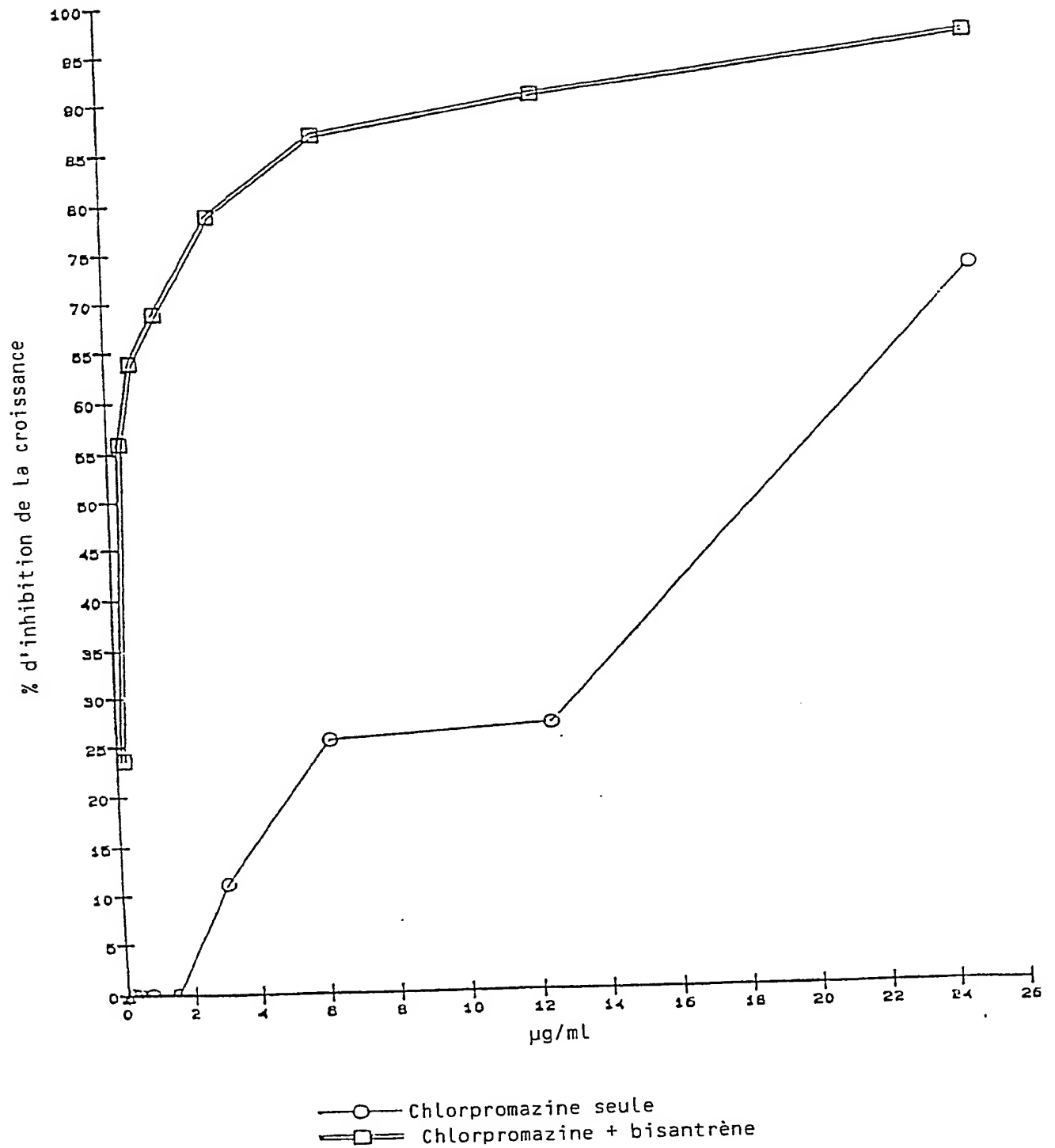


Figure 6

Effet de la quinidine sur l'inversion de la résistance au bisantrène dans les cellules d'OVCAR 3 S1R.

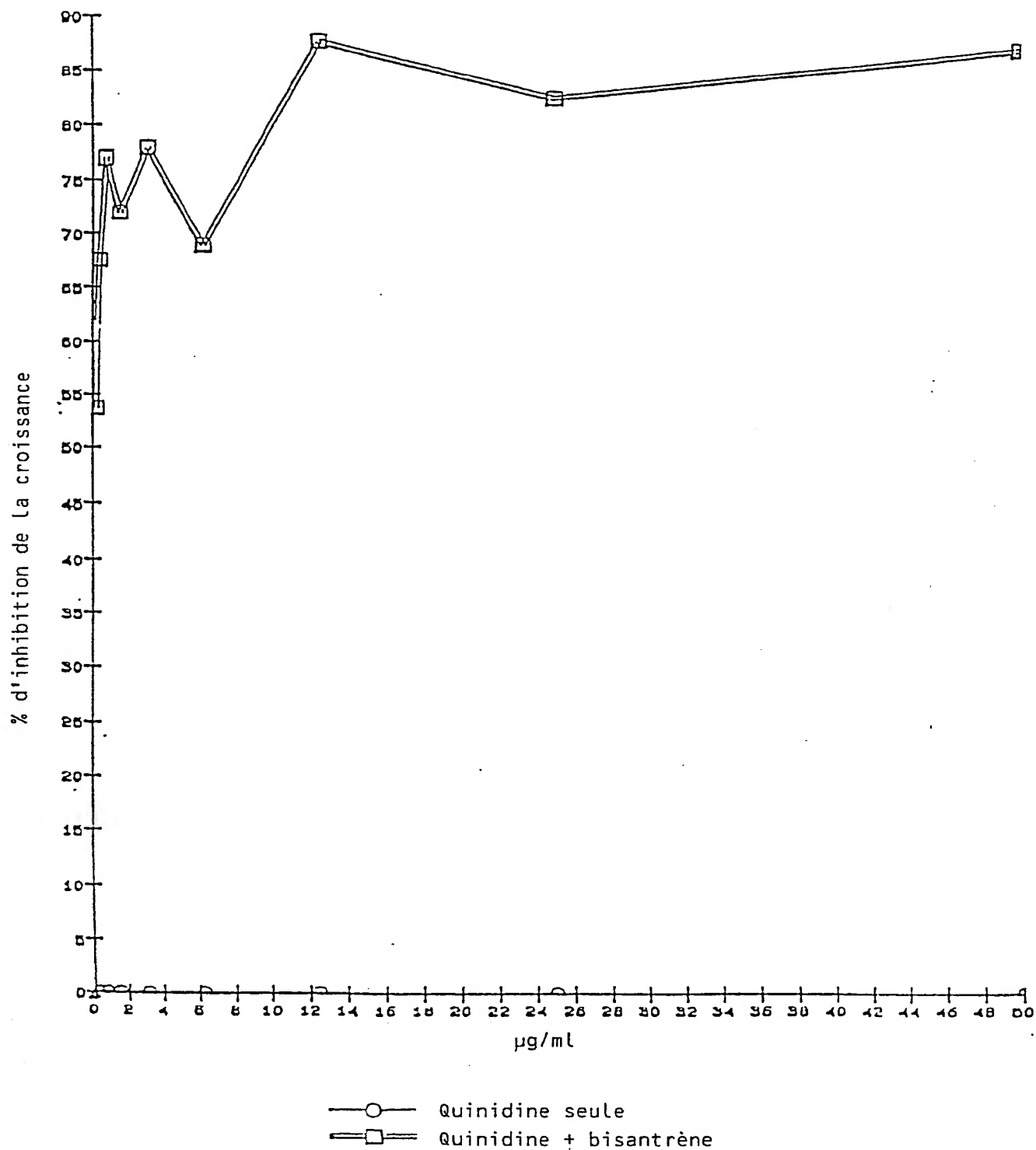


Figure 7

Effet de la chloroquine avec l'inversion de la résistance au bisantrène dans les cellules d'OVCAR 3 S1R.

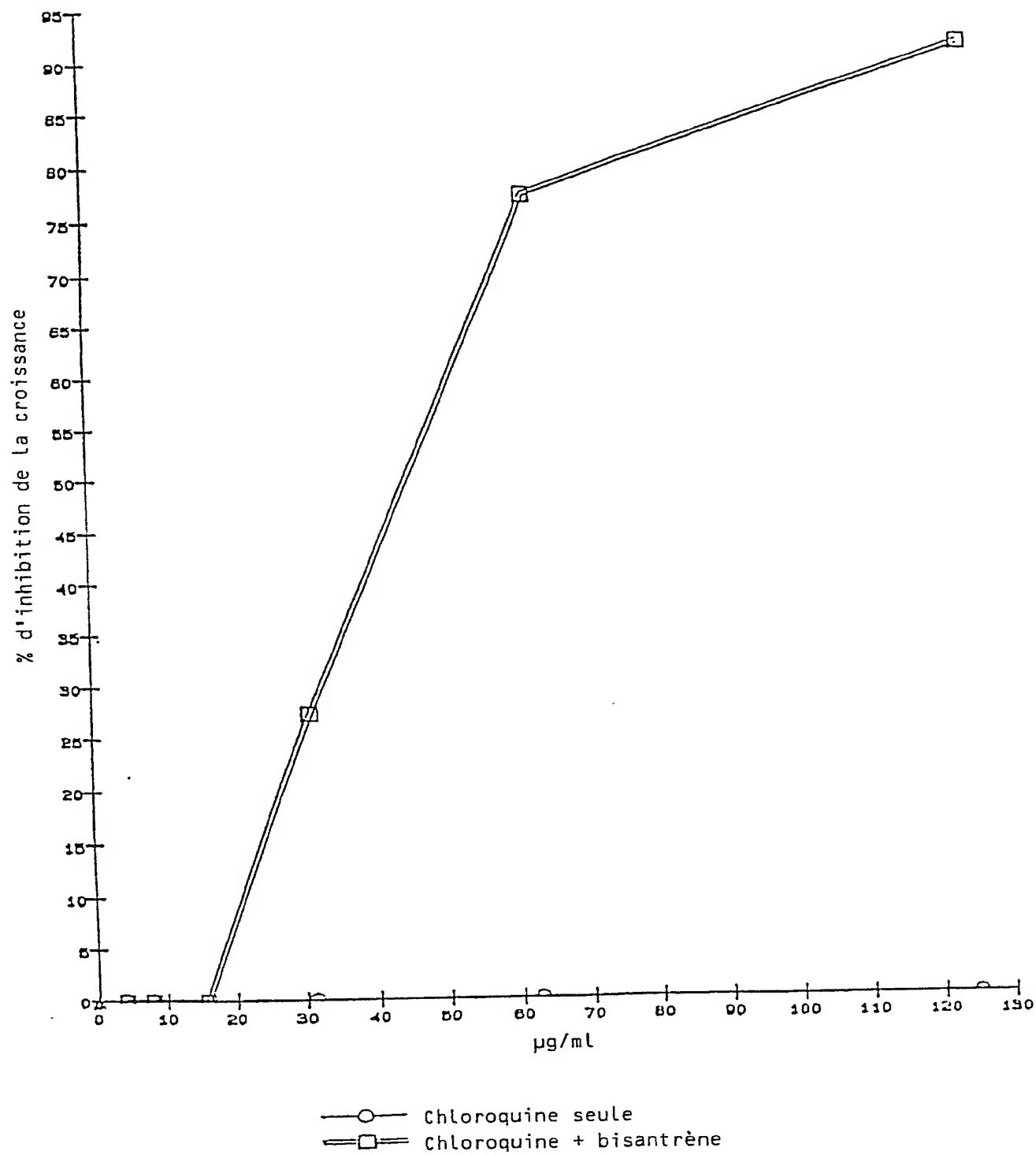


Figure 8

Effet de la perhexiline sur l'inversion de la résistance au bisantrène dans les cellules d'OVCAR 3 S1R.

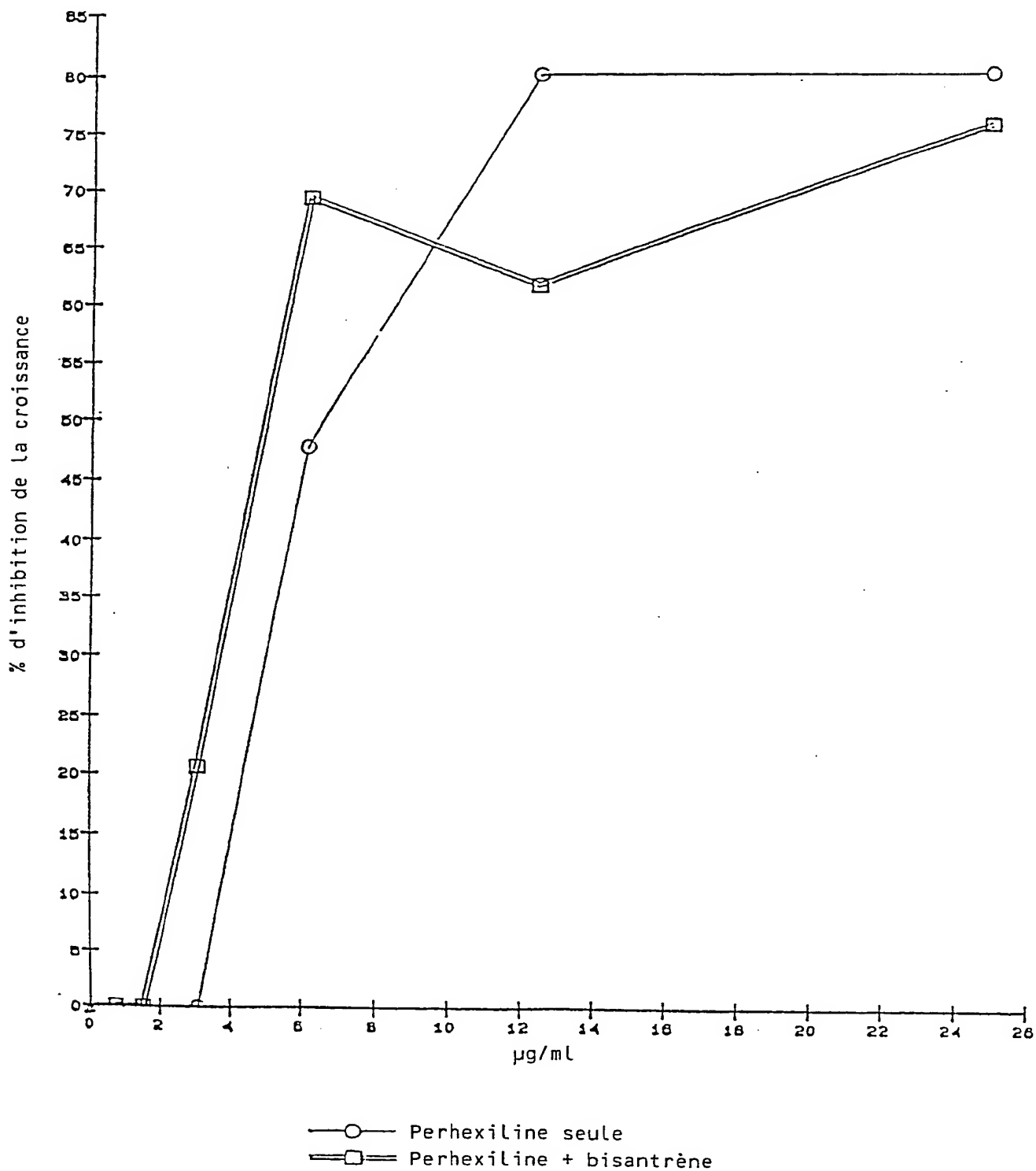


Figure 9

Effet de la nifédipine sur l'inversion de la résistance au bisantrène dans les cellules d'OVCAR 3 S1R.

